

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017682

International filing date: 29 November 2004 (29.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-419123
Filing date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

30.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年12月17日

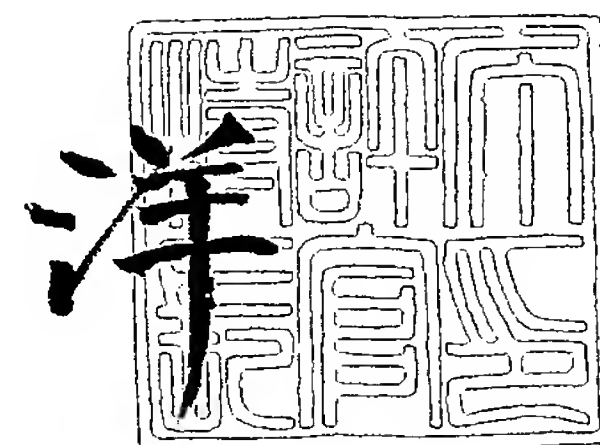
出願番号
Application Number: 特願2003-419123
[ST. 10/C]: [JP 2003-419123]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

2005年 1月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PS03-1603
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県東広島市高屋高美が丘 2 - 5 - 5
 【氏名】 菅井 基行
【発明者】
 【住所又は居所】 広島県広島市東区牛田新町 4 - 1 2 - 1 - 3 0 1
 【氏名】 小松澤 均
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100110249
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 下田 昭
【選任した代理人】
 【識別番号】 100113022
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 赤尾 謙一郎
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 205203
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

下記 (1) ~ (3) のいずれかのタンパク質から成るストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対する殺菌剤。

(1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質

(2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動 (zymography) において $100 \pm 10 \text{ kDa}$ に溶菌バンドを示すタンパク質

(3) 配列番号 2 に示す塩基配列から成る DNA 又は (1) のタンパク質をコードする DNA により形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質

【請求項 2】

請求項 1 に記載の殺菌剤を含有する虫歯予防剤、虫歯治療剤、歯みがき剤、口ゆすぎ剤、又は虫歯予防用ガム。

【請求項 3】

下記 (1) ~ (3) のいずれかのタンパク質を用いてストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスを選択的に殺菌する方法。

(1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質

(2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動 (zymography) において $100 \pm 10 \text{ kDa}$ に溶菌バンドを示すタンパク質

(3) 配列番号 2 に示す塩基配列から成る DNA 又は (1) のタンパク質をコードする DNA により形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌス
に対する殺菌剤

【技術分野】

【0001】

この発明は、虫歯原因菌であるストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)及びストレプトコッカス・ソブリヌス(*Streptococcus sobrinus*)に対して溶菌作用を有する酵素に関し、更に、この酵素を用いた虫歯治療方法や予防方法、更に、虫歯治療又は虫歯予防を目的としてこの酵素を用いた歯みがき剤、ガムなどに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトに齲食を起こすいわゆる齲食原因菌は無菌ラットを用いた実験的研究ならびに数々の疫学的研究から連鎖球菌群に属する*Streptococcus mutans*と*S. sobrinus*であることが明らかにされている(非特許文献1)。本発明者らは細菌が保有する巨大構造物ペプチドグリカン代謝分解する酵素(溶菌酵素)を研究する過程で*S. mutans*が産生する溶菌酵素に着目し、研究をすすめている(非特許文献2)。ペプチドグリカンは生物の中で真性細菌及び古細菌のみが有する構造物で、糖鎖とペプチド鎖がおりなすメッシュワーク構造を取り、菌体を包み込み、約20気圧といわれる内圧を受け止めて細菌の形を保持するための骨格にあたる構造物である。ペプチドグリカンはその特異性から、古くから抗菌化学療法剤の標的と関連づけて考えられてきた。いわゆる抗生物質の端緒となったペニシリンGに始まる β -ラクタム系薬剤を始め、多くの抗菌化学療法剤はペプチドグリカン生合成系に作用する薬物である。動物細胞が薬剤標的を持たないことから β -ラクタム系薬剤は優れた選択毒性を示し、副作用の少ない薬剤として汎用されてきた。

一方、馬場久衛らは、*S. mutans*が産生する本件に近似の酵素AL-7に関し発表しており(非特許文献3~5)、この酵素AL-7が*S. Sanguis*及び*S. mutans*の加熱菌体を選択的に溶解することを明らかにしている。

これら以外にも、*S. mutans*の産生する酵素に関していくつかの例が知られている(特許文献1~2等)。

【0003】

【特許文献1】 特開平10-136976

【特許文献2】 特開2002-114709

【非特許文献1】 日本細菌学雑誌 51(4): 931-951, 1996

【非特許文献2】 日本細菌学雑誌 52(2): 461-473, 1997

【非特許文献3】 J. Oral Biol., 25:947-955, 1983

【非特許文献4】 J. Oral Biol., 26:185-194, 1984

【非特許文献5】 神奈川歯学, 24-2, 384-392, 1989

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

従来、抗菌化学療法の考え方として薬剤が多く細菌に共通の標的を持ち、これらに致死的に働くことが望ましいとされてきた。しかしながら、このような作用は化学療法の対象とする細菌のみならず、常在細菌叢を形成している細菌群にも影響し、菌交代症を引き起こすこと、さらに細菌が耐性を獲得した際には、耐性が菌種を超えてまたたく間に広がるということが周知されるようになる。そのため、従来の抗菌剤とは異なり、特定の菌種にのみ働く抗菌化学療法薬の利用が模索されている。

即ち、本発明は、齲食原因菌を選択的に攻撃する酵素、及びこの酵素を用いた虫歯治療・予防法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

溶菌酵素は本来、細菌が分裂・細胞分離して増殖する過程でペプチドグリカンを代謝す

るために必要とされる酵素である。本発明者らは研究の過程で *S. mutans* が産生する溶菌酵素 Lyt100 を見出し、その遺伝子クローニング、組換え体を作成し、酵素の作用を検討してきた。その中で本酵素の基質特異性を検討する過程で、本酵素が *S. mutans* ならびに *S. sobrinus* を選択的に溶解する基質特異性を有することを見出した。*S. mutans* と *S. sobrinus* を選択的に溶解する酵素は口腔内の常在細菌叢に影響することなく、これら齲食原性細菌を溶解する優れた点を有する。本酵素を利用することで、口腔内の食齲原性細菌を選択的に除去、あるいはその菌数を減少させることが可能となり、齲食の予防効果を発揮させることができる。

【0006】

即ち、本発明は、下記 (1) ~ (3) のいずれかのタンパク質から成るストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対する殺菌剤である。

(1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質

(2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動 (zymography) において 100 ± 10 kDa に溶菌バンドを示すタンパク質

(3) 配列番号 2 に示す塩基配列から成る DNA 又は (1) のタンパク質をコードする DNA により形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質

また本発明は、この殺菌剤を含有する虫歯予防剤、虫歯治療剤、歯みがき剤、口ゆすぎ剤、又は虫歯予防用ガムである。これらを処方するに当たっては、各分野の常法に従って行えばよい。

【0007】

更に本発明は、下記 (1) ~ (3) のいずれかのタンパク質を用いてストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスを選択的に殺菌する方法である。

(1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加され、ストレプトコッカス・ミュータンス若しくはストレプトコッカス・ソブリヌスに対して溶菌性を有するタンパク質

(2) ストレプトコッカス・ミュータンス死菌体を含むゲルを用いた酵素電気泳動 (zymography) において 100 ± 10 kDa に溶菌バンドを示すタンパク質

(3) 配列番号 2 に示す塩基配列から成る DNA 又は (1) のタンパク質をコードする DNA により形質転換された細胞を培養することにより得られるタンパク質

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の酵素 Lyt100 は、*S. mutans* が産生する本件に近似の酵素 AL-7 (非特許文献 3) とは異なる。まず AL-7 は菌体外酵素であり Lyt100 は菌体内酵素である。更に、アッセイ系としてほぼ同じ条件で測定し、AL-7 は 20mg の酵素標品を用いて、*S. mutans* あるいは *S. sobrinus* に対し、加熱死菌で最大 17%、20.6% の溶菌活性を示し、細胞壁に対し 6%、8.3% の溶解活性を示す。これに対し Lyt100 は 3 μ g の酵素標品を用いて *S. mutans* と *S. sobrinus* に対し加熱死菌で最大 23%、33.6% の溶菌活性を示し、細胞壁に対し 96.7%、96.7% の溶解活性を示す。細胞壁に対する溶解活性が強い。一方、生菌に対しては AL-7 20mg の酵素標品を用いて、*S. mutans* に対し最大 3.2%、*S. sanguis* に対して 3.3% とほとんど溶菌を示さずかつ種特異性を示さないのに対し、Lyt100 は 10 μ g の酵素標品を用いて *S. mutans* と *S. sobrinus* に対し 44%、56%、*S. sanguis*、*S. salivarius*、*S. mitis* に対して 0% と特徴的で *S. mutans* 及び *S. sobrinus* に対し強い種特異的溶菌活性を示す。

本発明の酵素 Lyt100 は、病原菌 (*S. mutans*) が持つ酵素であり、同じ病原菌自身を溶菌/殺菌する。しかも種特異性が高く他の菌層に影響を与えないため、虫歯の治療/予防に利用出来る。

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例 1】

【0 0 0 9】

(1) 粗酵素標品の調整

Streptococcus mutans MT703R株を600 ml ブレインハートインフュージョン培地にて37℃、一晚振倒培養後、8,000 x g, 20 min遠心分離し、沈渣を得た(約1.2 g)。沈さに2 ml, 8M ureaを加え、懸濁し室温で30分間放置した。15,000 x g, 15 min遠心分離にかけ、上澄みを得る。得られた上澄みを限外ろ過膜(Amicon)を用いて濃縮した。最終的に1 mg/mlとして、これを粗酵素標品として用いた。

【0 0 1 0】

(2) 溶菌酵素Lyt100の発見

粗酵素標品を酵素電気泳動(Zymography)にかけた。酵素電気泳動は、溶菌酵素の活性を検出するために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を応用した方法である。まずポリアクリルアミドゲルを重合させる際に、*S. mutans*死菌体(1 mg/ml)を添加してゲルを固める。その後、通常の電気泳動と同様に泳動を行った後、取り出したゲルを水洗し、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)でインキュベートすることにより、ゲル中の溶菌酵素が活性を回復し、タンパク質バンドに相当する位置の菌体を溶解し、結果として白濁したゲルの中で透明なバンドとして検出できる。得られたゲルをZymogramという。

*S. mutans*死菌体は、培養した*S. mutans*を約100℃の熱水/4%SDS中で30~60分処理したのち十分量のPBSで10回程度洗浄したものを用いることができる。

【0 0 1 1】

この結果、図1に示すように、高分子量域に2本の溶菌バンドが認められた。粗酵素標品をSDS-電気泳動にかけた後、ゲル中のタンパク質をクマシーブリリアントブルーで染色し、先のZymogramと比較検討することから溶菌バンドに対応するタンパク質バンドを見極めた。そのタンパク質バンド2本(ふたつの溶菌活性に対応)を含むゲルを切り出し、ナイロン膜に転写し、気相アミノ酸シーケンサー(Model 49X Procise)にかけた。得られたアミノ酸配列(配列番号1)をもとにTIGR unfinished *Streptococcus mutans* UAB159 DNA sequence databaseを用いて、対応するアミノ酸配列に相当する塩基配列(配列番号2)を含有するDNA断片を見出した。

得られた二つのDNA断片は、同じタンパク質をコードしており、一方は合成されたタンパク質が分泌された後に、菌体上で他のタンパク質分解酵素によって限定分解を受けた結果生じた産物であることが明らかとなった。すなわち、Lyt100は24個のシグナル配列を持ち、成熟型で104.424 kDa、そのうちアミノ末端側182残基が限定分解を受けてはずれ、89.680 kDaとなることが明らかになった。

この全長のタンパク質をコードしているDNAをもとにプライマーを作成し(配列番号3、4)、*S. mutans* C67-1染色体を鋳型として成熟型酵素タンパク質をコードしているDNAを増幅した。このDNAを発現ベクターpQE30に組み込み、*E. coli* M-15を形質転換した。得られた形質転換体の一つをGY122と名付けた。

【0 0 1 2】

(3) 組み換え型溶菌酵素Lyt100の精製

大腸菌GY122株を500mlのLB液体培地で培養し(約4時間)、吸光度660 nmが0.5の時点でイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドを最終濃度1 mMとなるように添加した。さらに3時間培養し、培養液を遠心分離にかける。8,300 g x 30 minで遠心分離し、沈渣をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し(菌体1 gに対し10 ml)、懸濁、遠心分離の操作を2回繰り返す。再度得られた沈渣をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し(菌体1 gに対し10 ml)、氷冷下で超音波破碎(TOMY Seiko level 4, 50%間隔, 20 min)し、破碎標品を遠心分離した。沈渣に0.2% Triton X-100 含有PBSを加え懸濁し(沈渣1 gに対し10 ml)、室温で30 min放置した。再度、この操作を繰り返し、得られた沈渣を8M urea, 0.1M Na₂PO₄, 0.01 M Tris-Cl (pH8.0)に溶解した。得られた溶液をNi-NTA レジンビーズ(1 ml)に添加し、8~10倍量の8M urea, 0.1M Na₂PO₄, 0.01 M Tris-Cl (pH6.3)で洗浄した。その後、8M urea, 0.1M Na₂PO₄, 0.01 M Tris-Cl (pH5.4)で溶出し、1分画500 µlで15~20分画を採取した。各分画を溶菌アッセイにかけ、活性分画を集め、1M NaCl, 1M urea含

有0.1M リン酸緩衝液によって4℃で一晩透析した。透析した標品をあらかじめ1M NaCl, 1M urea含有0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0 (A buffer) で平衡化した高速液体クロマトグラフィ用カラム TSKgel Phenyl-5PW(75 mm×7.5 mm, lot 5PHR0050)に添加し、十分量の上記緩衝液で洗浄後、A bufferからB buffer (1M urea含有0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0)へ流速0.5 ml/minで30分間の直線グラジエント溶出を行った。図2に示すように活性は実線で示す位置に溶出される。

図3に精製前ならびに精製後の標品のSDS-電気泳動像を示す。Lyt100は約100 kDa (100 ±10kDa) の位置に泳動され、目的のタンパク質が精製できたことを示している。

【実施例2】

【0013】

(4) 死菌体を用いた溶菌活性の測定

口腔レンサ球菌として以下の5株を用いた。S. mutans C67-1, S. sobrinus OMZ176a, S. mitis ATCC9811, S. sanguis ATCC10436, S. salivarius ATCC9222。

4% SDS添加煮沸水中で加熱処理した死菌体を十分量の水で洗浄し、あらかじめTurbidity buffer (0.1 M リン酸緩衝液、0.1 M NaCl, 1 mM Ca, pH 6.8)で懸濁し吸光度660 nm=0.3 に調整した。菌懸濁液2 mlに精製Lyt100を添加し、時間経過とともに吸光度の変化を測定した。

死菌体の溶解活性を図4～6に示す。Lyt100はS. mutans C67-1, S. sobrinus OMZ176aに対して強い溶菌活性を示し、特にS. sobrinus OMZ176aに対してはS. mutans C67-1と比較して倍の活性を示した。

【実施例3】

【0014】

(5) 生菌体を用いた溶菌活性と殺菌作用の測定

口腔連鎖球菌として以下の5株を用いた。S. mutans C67-1, S. sobrinus OMZ176a, S. mitis ATCC9811, S. sanguis ATCC10436, S. salivarius ATCC9222。

培養した菌をそれぞれTurbidity bufferに懸濁した。あらかじめ、連鎖を分散させるため、S. mutans については超音波破碎機でlevel 4, 10 sec処理、他の菌種はlevel 4, 5 sec処理したのち吸光度660nm-0.5に調整した。菌懸濁液2 mlに精製Lyt100 を添加し、時間経過とともに吸光度の変化を測定した。また同時期にサンプルを採取し、104-105倍希釈したものをS. mutans C67-1, S. sobrinus OMZ176a, S. salivarius ATCC9222についてはブレインハートインフュージョン寒天培地、S. mitis ATCC9811, S. sanguis ATCC10436についてはMS寒天培地に播き、コロニー数を計算した。

【0015】

生菌体の溶解活性を図7, 8に示す。一般的に生菌は死菌に比較して酵素に対して感受性が低くなる。Lyt100は死菌体のアッセイでは3 μg/2 mlで用いたが生菌体のアッセイでは10 μg/2mlで使用した。この場合もLyt100はS. mutans C67-1とS. sobrinus OMZ176aに強い溶菌活性を示した。

生菌体の致死活性を図9, 10に示す。Lyt100処理した生菌の懸濁液よりcolony forming unitを算出した結果、濁度の低下とほぼ同様の傾向を示し、Lyt100はS. mutans C67-1とS. sobrinus OMZ176aに選択的な殺菌効果を示すことが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】 本発明の酵素Lyt100のZymogramを示す図である。

【図2】 本発明の酵素Lyt100の、TSKgel Phenyl-5PWを用いたカラムクロマトグラフィを示す図である。下線は溶菌活性を持つ領域を示す。

【図3】 精製標品の電気泳動及びZymogramを示す図である。

【図4】 本発明の酵素Lyt100の死菌体に対する溶菌活性を示す図である。縦軸は濁度(通常660nmの吸光度)、横軸は時間(分)を示す。

【図5】 本発明の酵素Lyt100の死菌体に対する溶菌活性を示す図である。縦軸は濁度(通常660nmの吸光度)、横軸は時間(分)を示す。

【図 6】 本発明の酵素Lyt100の死菌体に対する溶菌活性を示す図である。180分の時点での濁度を、S.mutansを基質とした時を100%として、示す。

【図 7】 本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する溶菌活性を示す図である。縦軸は濁度（通常660nmの吸光度）、横軸は時間（分）を示す。

【図 8】 本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する溶菌活性を示す図である。180分の時点での濁度を、S.mutansを基質とした時を100%として、示す。

【図 9】 本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する致死活性を示す図である。縦軸はコロニー（生きた菌の数）、横軸は時間（分）を示す。

【図 1 0】 本発明の酵素Lyt100の生菌体に対する致死活性を示す図である。縦軸はコロニー（生きた菌の数）、横軸は時間（分）を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対する殺菌剤

<130> PS03-1603

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 979

<212> PRT

<213> Streptococcus mutans

<400> 1

Met Lys Ser Lys Thr Tyr Leu Met Ile Pro Leu Ala Leu Thr Leu Phe
 1 5 10 15

Met Ala Ala Asn Lys Ile Ser Ala Asp Glu Gln Asn Gln Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Glu Val Ile Ser Ser Asp Ala Thr Ser Val Ser Glu Leu Pro
 35 40 45

Ala Thr Thr Ala Gln Ile Ser Gln Glu Val Arg Asn Asn Gly Gln Asp
 50 55 60

Ser Thr Ile Gln Leu Gln Gln Thr Gln Glu Gln Ser Asp Pro Ile Thr
 65 70 75 80

Ser Thr Ser Glu Thr Thr Val Ser Ser Met Lys Ala Val Thr Asn Gly
 85 90 95

Ser Pro Ala Lys Ala Asn Glu Thr Glu Thr Val Pro Ser Gln Ala Ser
 100 105 110

Thr Ala Ser Ser Val Gln Thr Pro Asp Gln Ile Ser Thr Val Pro Ser

115

120

125

Val Lys Ala Glu Thr Thr Ser Thr Ala Asp Gln Leu Gln Ser Thr Ser
130 135 140

Ser Ala Pro Leu Asp Gln Gln Thr Asp Ala Lys Arg Leu Ser Asn Lys
145 150 155 160

Met Thr Pro Ala Ser Ser Val Gln Ala Arg Ser Ser Leu Thr Gln Asp
165 170 175

Lys Gln Val Gln Ala Gln Glu Val Thr Ser Ala Val Val Glu Glu Lys
180 185 190

Gly Ile Lys Leu Gln Tyr Asn Gly Gln Ile Ala Arg Asn Thr Lys Ile
195 200 205

Gln Phe Ala Val Trp Ser Ala Arg Asn Asp Gln Asp Asp Leu Gln Trp
210 215 220

Tyr Thr Ala Asn Asn Met Gly Ala Ala Tyr Ala Glu Phe Lys Asn His
225 230 235 240

Arg Glu Tyr Gly Thr Tyr Tyr Val His Thr Tyr Ala Asn Gln Asn Gly
245 250 255

Lys Met Ile Gly Leu Asn Ala Thr Thr Leu Thr Ile Ala Gln Pro Gln
260 265 270

Val Gln Thr Asn Ile Gln Arg Lys Ser Ala Thr Asn Phe Glu Leu Thr
275 280 285

Val Ser Asn Val Pro Asn Thr Ile Ser Ser Ile Met Val Pro Val Trp
290 295 300

Ser Asp Gln Asn Gly Gln Asp Asp Ile Lys Trp Tyr Asn Ala Arg Lys
305 310 315 320

Ala Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Ala Leu Ile Asp Thr Lys Asn His Lys
325 330 335

Asn Asp Leu Gly His Tyr Glu Ala His Ile Tyr Gly Tyr Ser Thr Val
340 345 350

Thr Gln Ser Gln Ile Gly Leu Ala Val Ser Ser Gly Phe Asp Arg Asn
355 360 365

Asp Thr Arg Pro Asn Ala Arg Ile Ser Val Ala Asp Tyr Asp Gln Asn
370 375 380

Lys Thr Thr Phe Asp Val Val Val Glu Gly Ser Ser Asp Thr Lys Thr
385 390 395 400

Val Ser Ala Val Asn Ile Ala Val Trp Ser Glu Asp Lys Gly Gln Asp
405 410 415

Asp Leu Lys Trp Tyr Ser Pro Lys Ile Val Asn Asn Lys Ala Thr Val
420 425 430

Thr Ile Asn Ile Ala Asn His Ser Asn Thr Ser Asp Lys Tyr Asn Val
435 440 445

His Val Tyr Thr Asp Tyr Thr Asp Gly Thr His Ser Gly Thr Ile Leu
450 455 460

Gly Ala Tyr Gln Ile Asn Lys Pro Leu Glu Lys Asn Thr Val Ser Ala
465 470 475 480

Asp Leu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Asp Ser Asn Thr Val
485 490 495

Thr Asp Tyr Thr Lys Val Arg Phe Ala Val Trp Ser Asp Gln Asn Gly
500 505 510

Gln Asp Asp Leu Lys Trp Tyr Ser Ala Asn Ser Asp Gly Ala Ala Thr

515

520

525

Ala Ala Tyr Ser Asn His Ser Gly Tyr Gly Leu Tyr His Ile His Thr
530 535 540

Tyr Ile Ile Lys Asp Gly Glu Met Val Gly Leu Asn Gly Arg Thr Ile
545 550 555 560

Thr Ile Asn Gln Pro Ser Ala Lys Val Asp Ile Ala Lys Glu Ser Asp
565 570 575

Ala Leu Tyr Lys Val Thr Val Ser Asn Leu Pro Ala Tyr Ile Ser Ser
580 585 590

Val Ala Ile Pro Val Trp Thr Asp Lys Asn Asn Gln Asp Asp Ile Gln
595 600 605

Trp Ile Leu Ala Thr Lys Gln Gly Asp Gly Thr Tyr Ala Ala Gln Ile
610 615 620

Gln Leu Ala Asp His Asn Gly Glu Thr Gly His Tyr Asn Val His Val
625 630 635 640

Tyr Gly Gln Ser Lys Phe Asp Asn Lys Thr Val Gly Leu Ala Ala Thr
645 650 655

Asp Gly Phe Asn Val Ala Glu Thr Arg Asn Ala Val Ile Ala Ala Ser
660 665 670

Asn Tyr Asn Ala Ser Ala Gly Thr Ile Asp Met Ile Val Lys Gln Glu
675 680 685

Ala Gly Gly Lys Ala Ile Lys Glu Val Arg Ile Ala Ala Trp Ser Glu
690 695 700

Ala Asp Gln Ser Asn Leu His Trp Tyr Val Ser Ser Thr Ile Ile Asp
705 710 715 720

Gly Lys Val Thr Val Thr Ile Asn Glu Lys Asn His Gln Tyr Ile Lys
725 730 735

Gly Asn Tyr Asn Ile His Val Tyr Val Asp Tyr Thr Asp Gly Thr Ser
740 745 750

Ser Gly Thr Asn Ile Gly Asn Tyr Ser Leu Asn Ala Asp Lys Pro Ala
755 760 765

Val Ala Leu Pro Ser Tyr Phe Ile Asp Ile Ser Ser His Asn Gly Ile
770 775 780

Ile Ser Val Ala Glu Phe Asn Ser Leu Lys Gln Gln Gly Ile Gln Gly
785 790 795 800

Val Val Val Lys Leu Thr Glu Gly Thr Ser Tyr Ile Asn Pro Tyr Ala
805 810 815

Ser Ser Gln Ile Ala Asn Ala Arg Ala Ala Gly Ile Lys Val Ser Ala
820 825 830

Tyr His Tyr Ala His Tyr Thr Ser Ala Ala Gly Ala Gln Glu Glu Ala
835 840 845

Arg Tyr Phe Ala Asn Ala Ala Arg Ser Phe Gly Leu Glu Ala Ser Thr
850 855 860

Val Met Val Asn Asp Met Glu Glu Ser Ser Met Val Asn Asn Ile Asn
865 870 875 880

Asn Asn Val Gln Ala Trp Gln Asp Glu Met Arg Arg Gln Gly Tyr Ser
885 890 895

Asn Leu Ile His Tyr Thr Met Ala Ser Trp Leu Asp Ile Arg Gly Gly
900 905 910

Gln Val Asp Thr Ala Arg Phe Gly Ile Asn Asn Phe Trp Val Ala His

915

920

925

Tyr Ala Lys Gly Tyr Thr Tyr Met Thr Gln Glu Glu Ala Lys Ser Leu
 930 935 940

Asn Tyr Tyr Ala Asn Ala Ala Ala Trp Gln Tyr Thr Ser Val Ser Ser
 945 950 955 960

Lys Leu Ser His Ala Leu Asp Glu Asn Ile Asp Tyr Thr Gly Arg Phe
 965 970 975

Thr Gln Gln

<210> 2
 <211> 2940
 <212> DNA
 <213> Streptococcus mutans

<400> 2
 atgaaaagca aaacttatatt gatgattcca ttagcattga ccctatttat ggctgctaatt 60
 aaaatatctg cagatgagca aaatcaatcc ttaagtgcatt cagaagttat ttctttctgat 120
 gcgacatcag tatctgaatt accagcgaca acagcacaga taagtcagga agtcagaaat 180
 aatggacaag acagtactat tcaattgcag caaacacagg aacagtctga tccgataaca 240
 agtacgtctg agacaactgt ttcttctatg aaggcgggtca caaatggctc acctgccaaa 300
 gcaaattgaga ctgaaacagt tccgtctcag gcaagtactg ctagttctgt gcagactcct 360
 gatcagattt cgactgttcc ctctgtaaaa gcagaaacca cttctaccgc agatcaatta 420
 caatcaacat catctgctcc tttggatcaa caaactgatg ctaaactgtt ttccaataaa 480
 atgactccag caagcagcgt acaagctcgt tcttctctta cacaagacaa gcaagtacag 540
 gcacaggaag tcacaagtgc tgtagtgga gaaaaaggga ttaagctaca gtataacggt 600
 cagatcgctc gaaataactaa gattcaattt gctgtctggt cagctcgaaa tgatcaagat 660
 gatcttcaat ggtatacggc aaataatatg ggagcggcct atgctgaatt caagaatcat 720
 cgtgagtatg ggacctatta tgttcatact tatgctaatt aaaatggcaa gatgatagga 780

cttaacgcaa caactcttac aattgctcaa cctcaggtgc aaactaatat tcaaagaaaa 840
tcagcaacga attttgagtt aaccgtttct aatgttccta atactattag cagcatcatg 900
gtacctgtct ggtcagatca aaacgggtcaa gatgatatta aatgggtataa tgcccgaag 960
gctgatgatg gcagttataa ggctttgatt gataactaaa atcacaagaa tgatttggga 1020
cattatgaag ctcatattta cggctacagc acagtaacc agtctcaaat tggcttagct 1080
gttagttctg gttttgaccg caatgatact agaccaatg caaggatatac tgttgctgat 1140
tatgaccaa ataaaacgac ctttgatgtt gttgttgagg gttcatctga taaaagact 1200
gtatctgctg ttaatatgac tgtttggtct gaagataaag gtcaagatga ccttaagtgg 1260
tattcaccaa aaattgtcaa caataaggca actgtgacga ttaatatcgc taatcattca 1320
aatacttcag ataaatataa tgtccatgtt tatacagact acactgatgg gacacattct 1380
ggtactatit taggggctta tcagatcaat aaaccgcttg agaaaatac tgtttcagct 1440
gatttaacta gtgatggcat tgctctcaaa ttagattcaa acacggttac agattatacc 1500
aaagtacgat ttgccgtttg gtcggatcaa aatgggtcaag atgatctcaa gtggtatagt 1560
gcaaatagtg atggagcggc aactgcagct tacagtaacc acagtgggta tgggctttat 1620
catatccata cttatattat taaagatggg gaaatgggtg ggcttaatgg cagaacgata 1680
actattaatc agcctagtgc caagggtgat attgctaaag aatccgatgc tctttataaa 1740
gtgactgttt ctaacctgcc agcttacatt agttcagtag ctattcctgt ctggacagat 1800
aaaaacaatc aagatgatat tcaatggatt ctgcgcgaaa aacaagggtga tggaacctac 1860
gcagcgcaaa ttcagtttagc tgatcataat ggggaaacag gccattataa tgttcatgtc 1920
tatggacaaa gtaaatttga caataaacg gttggcttag cagcaactga tggctttaat 1980
gttgcagaga caaggaatgc tgttatcgct gcttcaaatt ataatgccag tgcaggaacg 2040
atagatatga ttgttaaaca agaagcgggt ggtaaagcga tcaaagaagt tcggatagct 2100
gcttgggtcag aagctgatca atctaacctt cattgggtatg tttcatcaac tattattgat 2160
ggtaaggtaa cagtcacat taatgaaaaa aatcatcaat atattaaagg aaattataac 2220
attcatgtct atgttgatta tactgatggc actagtagcg gaaccaatat tggaactat 2280

agcttgaatg ctgataaacc tgctgttgct ctgccatctt actttattga tattagtagc 2340
cacaatggaa tcatttctgt tgccgaattc aatagcttga aacaacaagg tattcaagga 2400
gtggttgtta agttaacaga aggtacaagc tacatcaatc cttatgcaag ttctcaaatt 2460
gccaatgcca gagctgccgg tattaagggtt tctgcttacc actatgctca ctatacttct 2520
gcggctgggg cacaagaaga agcccgttat ttgctaatag cagccagatc ctttggtttg 2580
gaggcatcaa ctgtcatggt caatgatatg gaagagtcct ctatgggtgaa caatattaat 2640
aataatgttc aagcttggca agatgagatg aggcgtcaag gttatagcaa cctgattcat 2700
tatactatgg ctagttgggt ggatatacgc ggtgggcaag tagacactgc aaggtttggc 2760
atcaataatt ttgggttgc tcattatgcc aaagggtata cttatatgac tcaagaagaa 2820
gctaaatccc ttaattatta tgctaatagc gcagcttggc agtatactag tgtatcgtct 2880
aaattgtctc atgctttgga tgaaaatatt gattatactg gtcgatttac tcaacagtaa 2940

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
agttcctgcc atactactgt 20

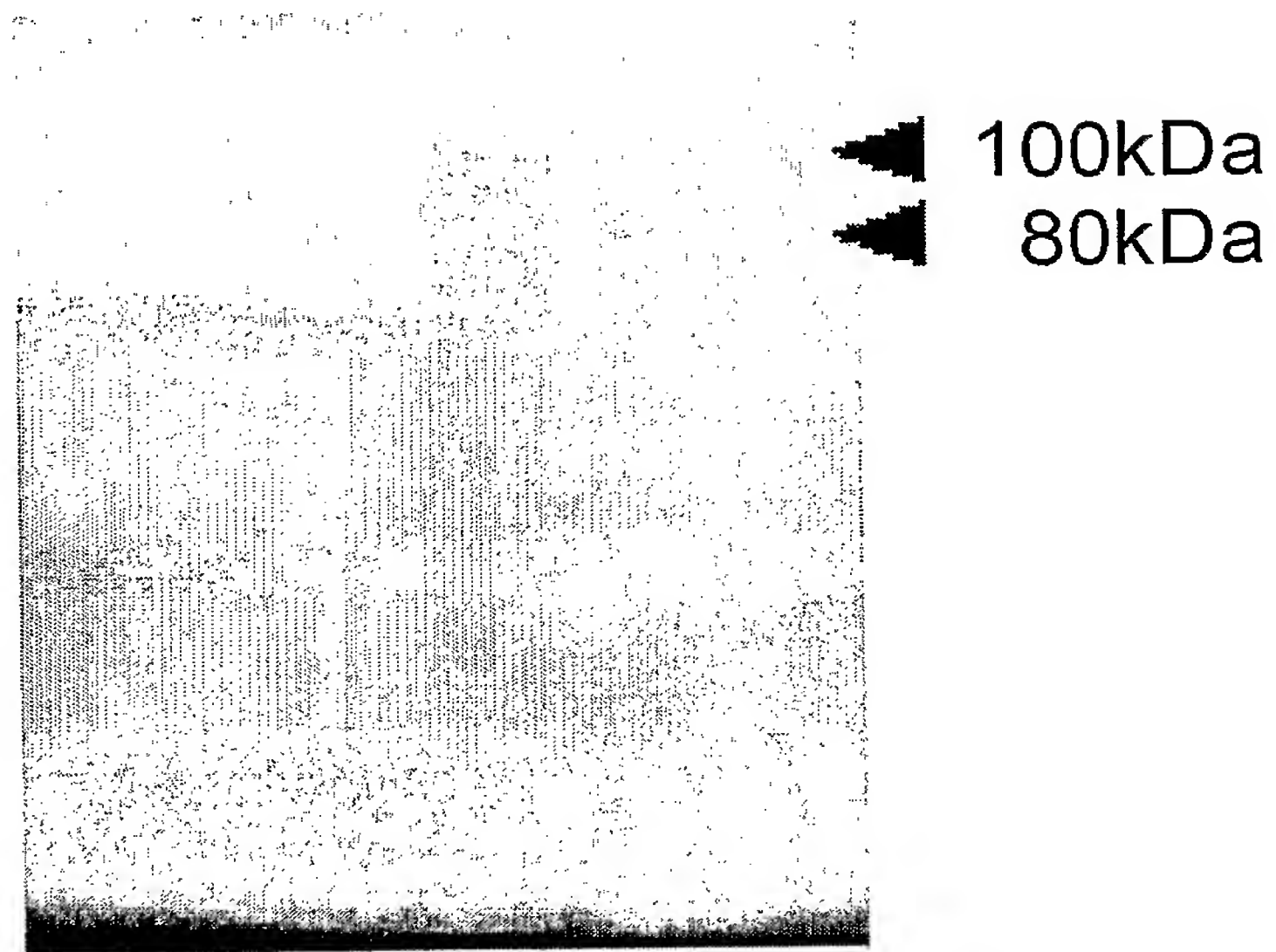
<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

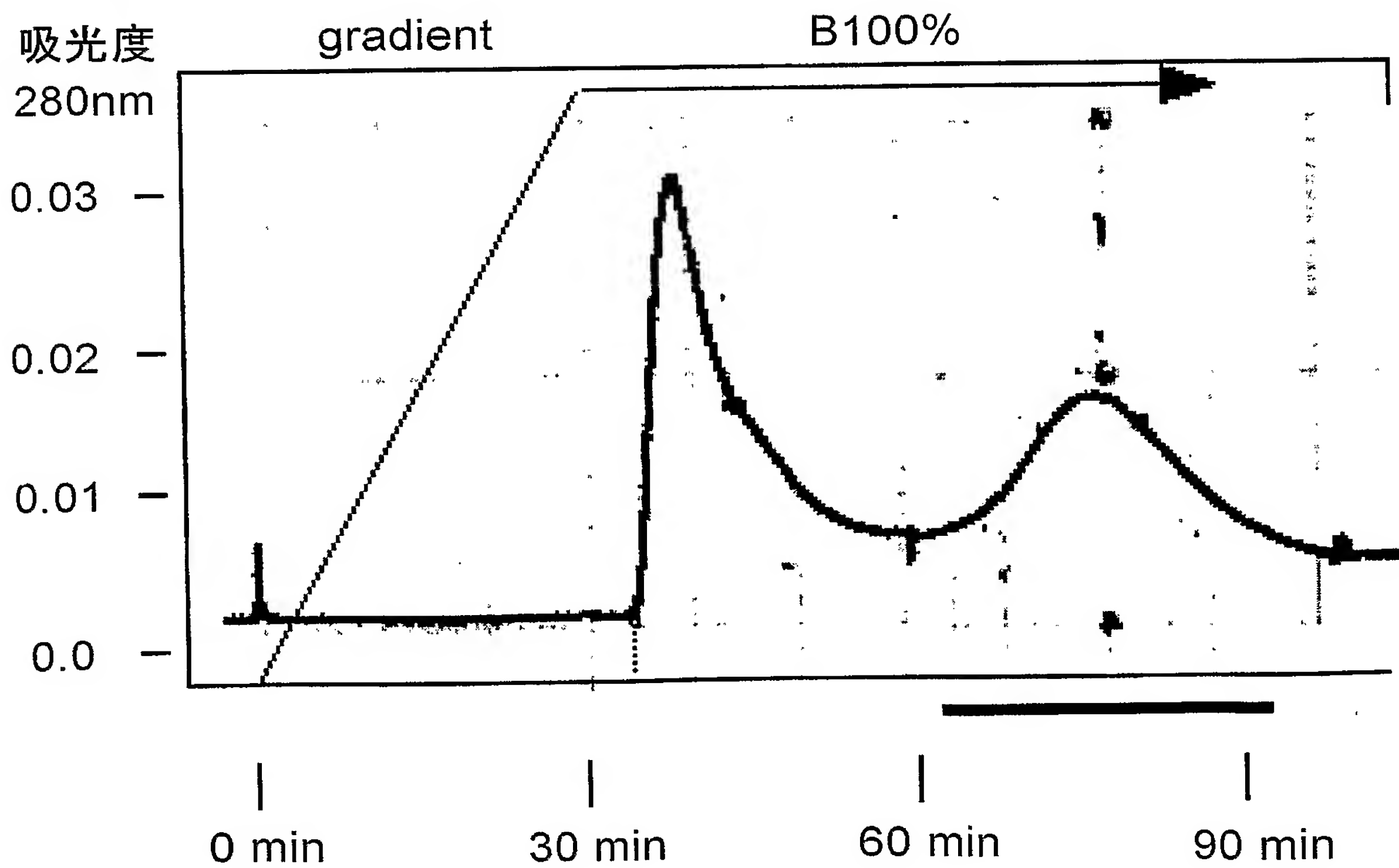
<400> 4
caggatccgt acaagctcgt tcttctct 28

【書類名】 図面

【図 1】

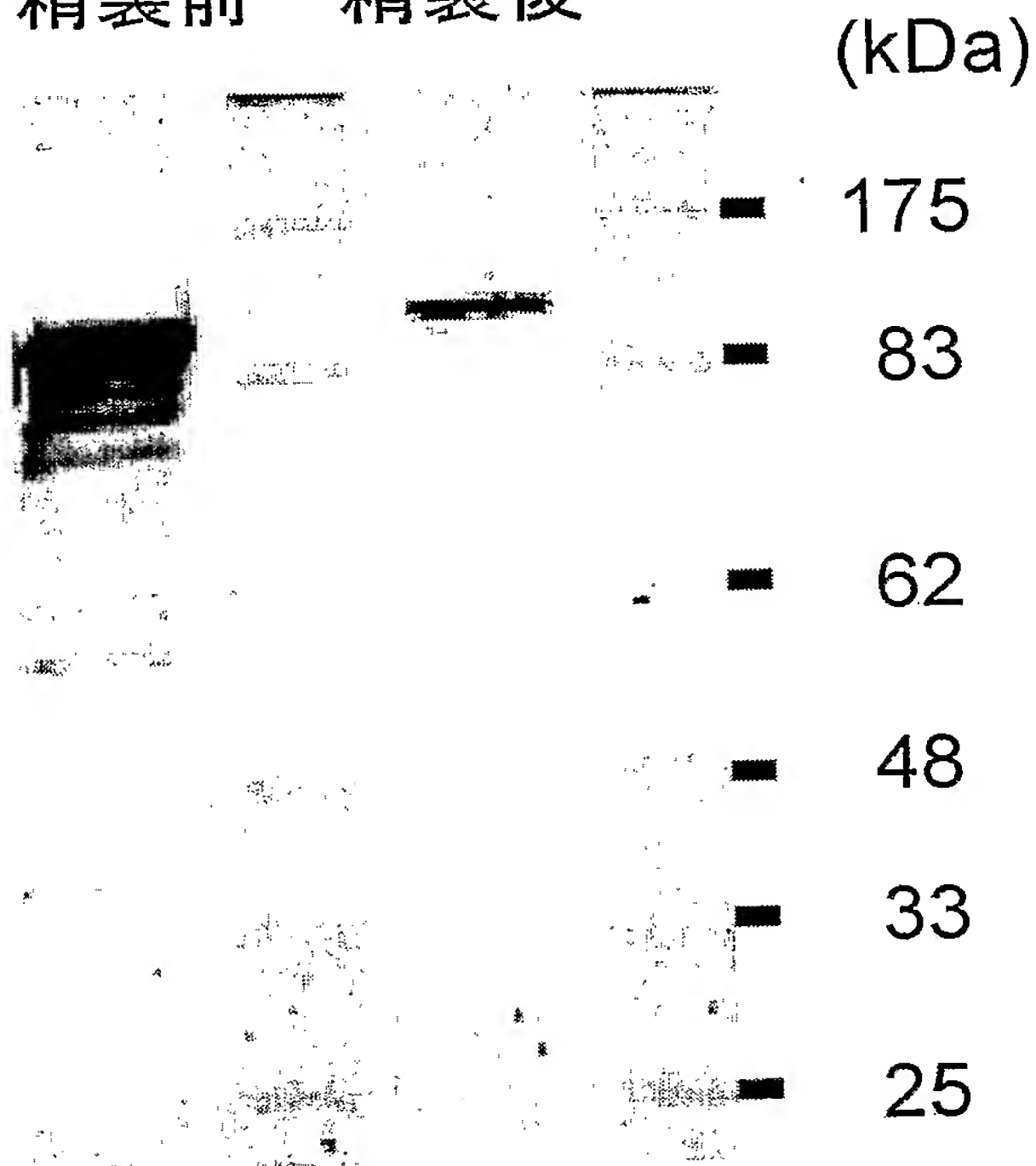


【図 2】



【図 3】

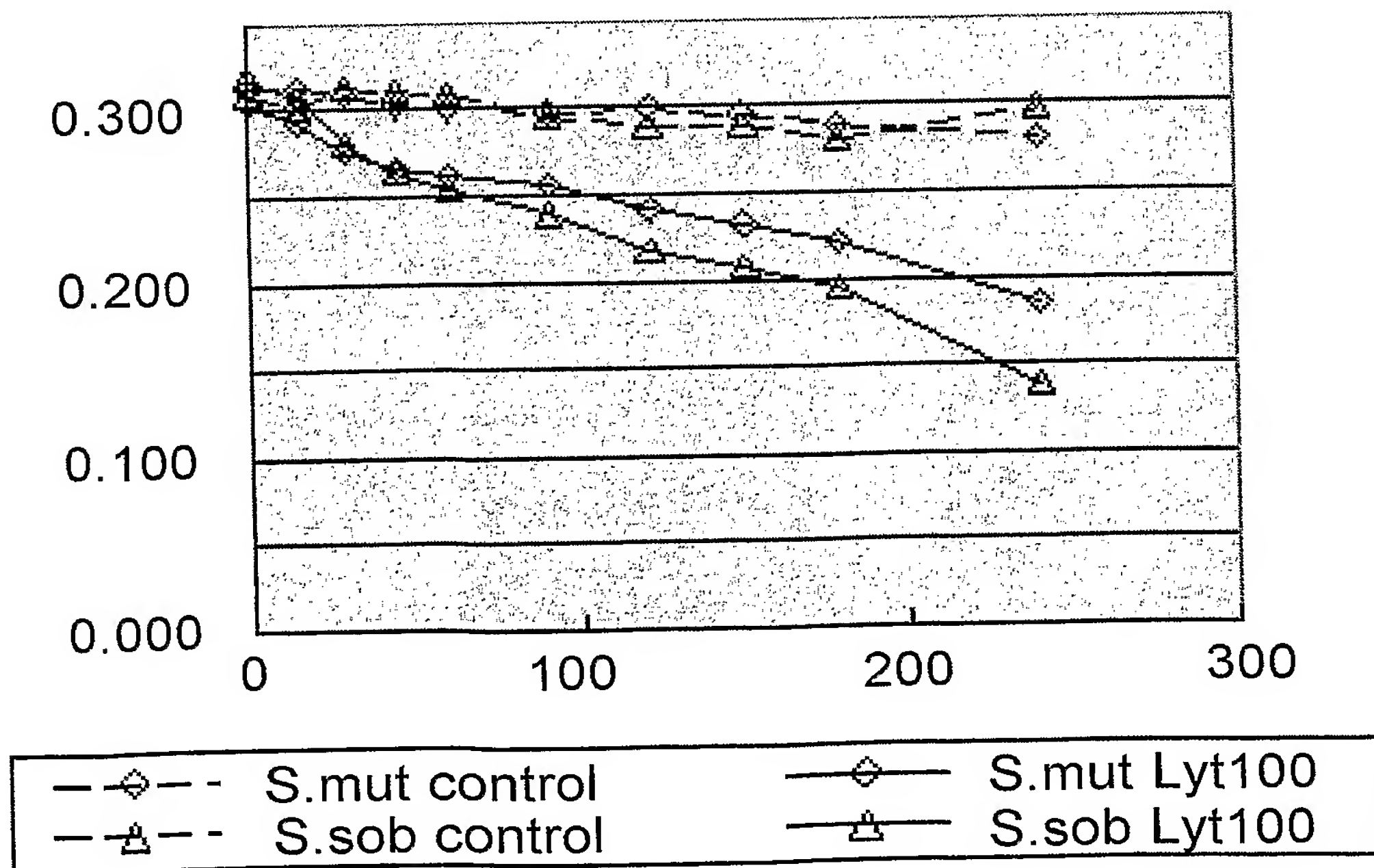
精製前 精製後



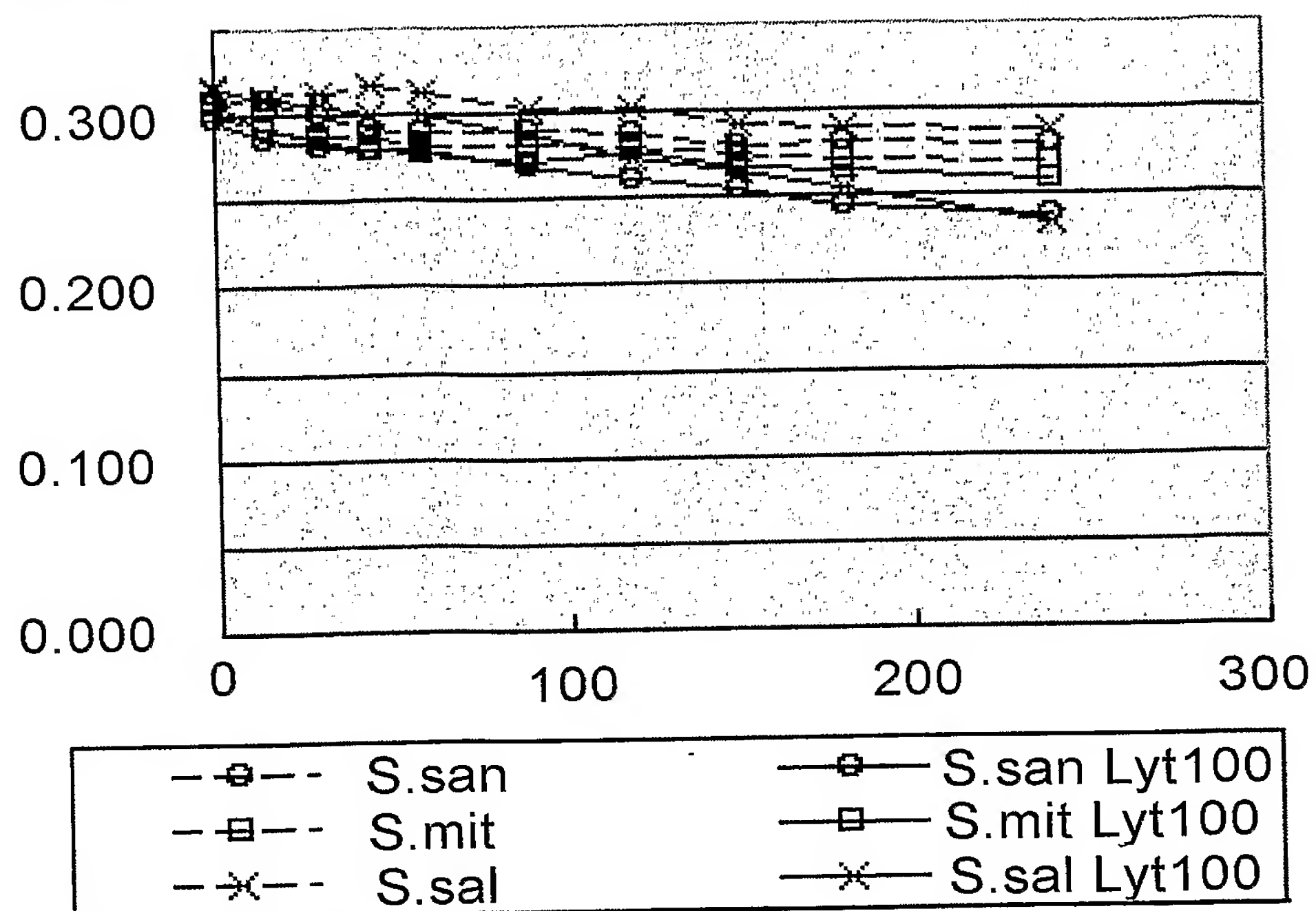
12%SDS-PAGE coomassie

Zymogram
12% S.mutans gel

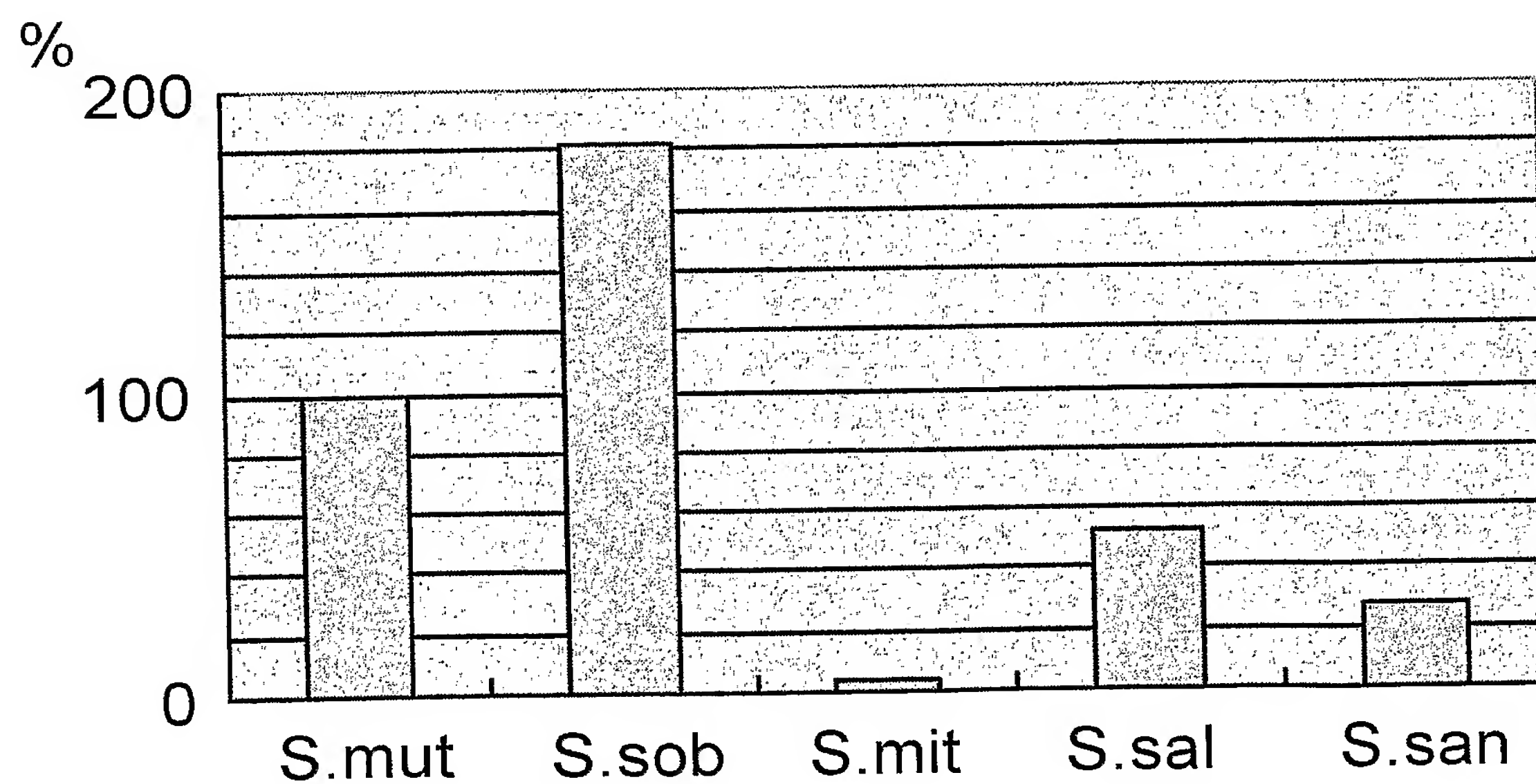
【図 4】



【図 5】

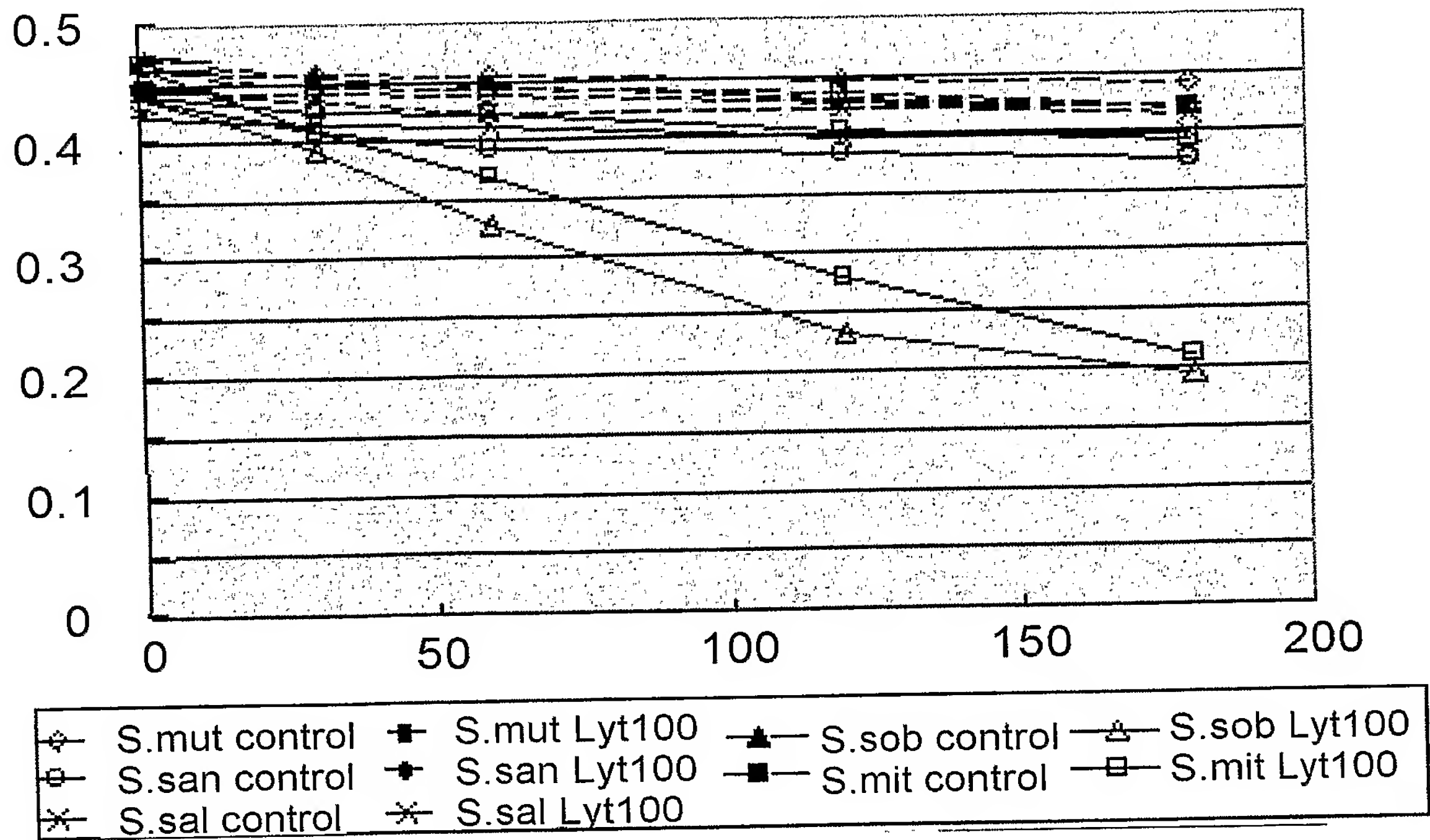


【図 6】

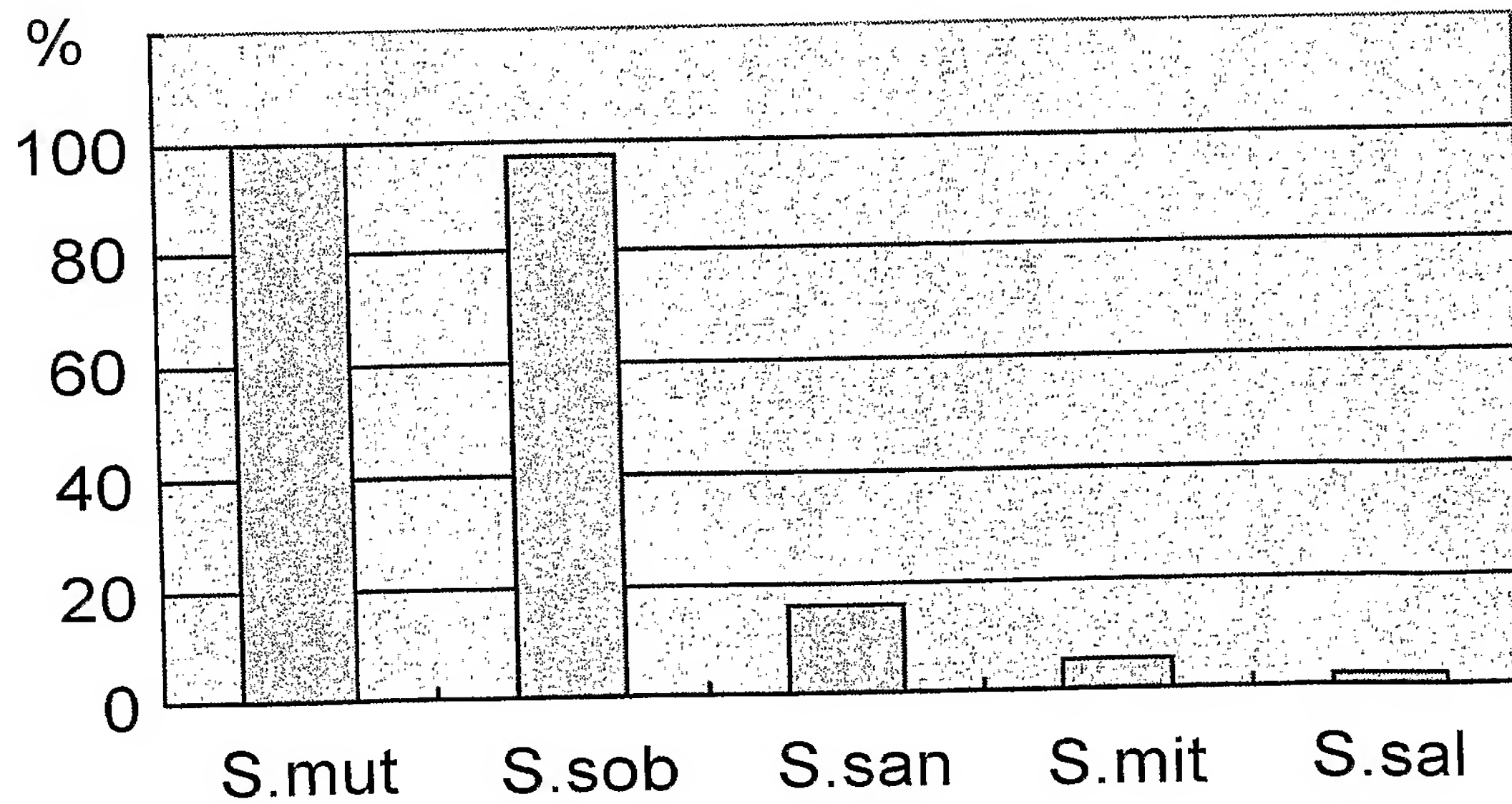


【図 7】

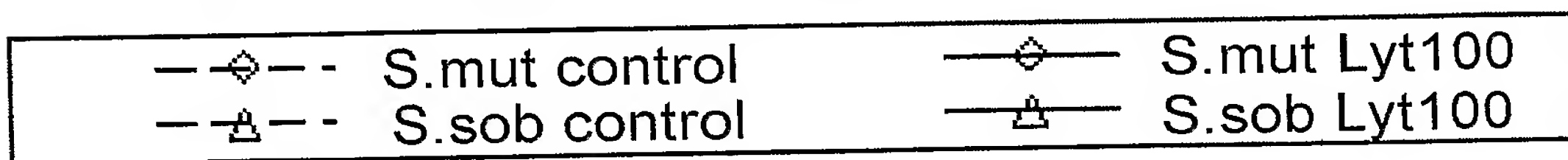
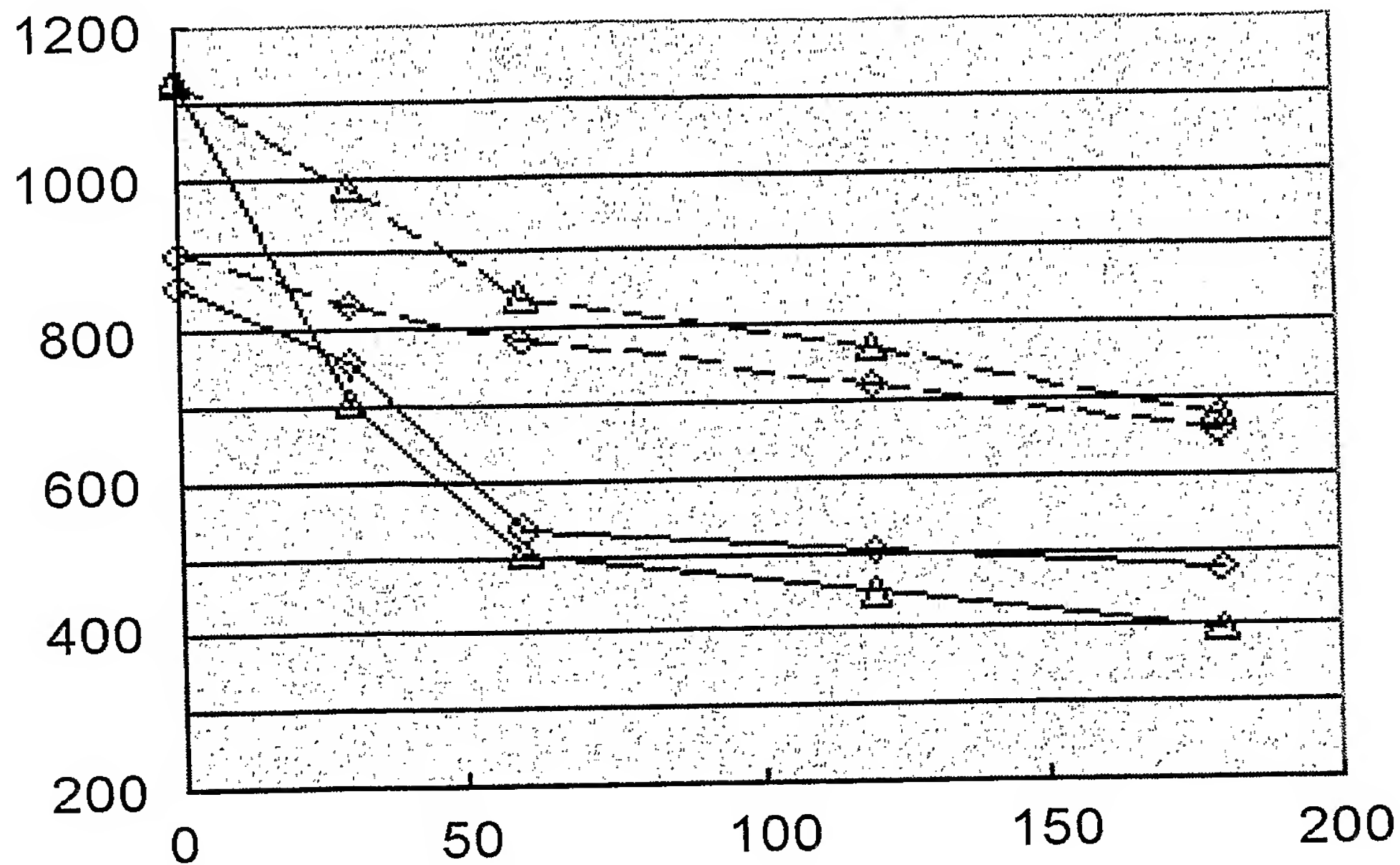
濁度



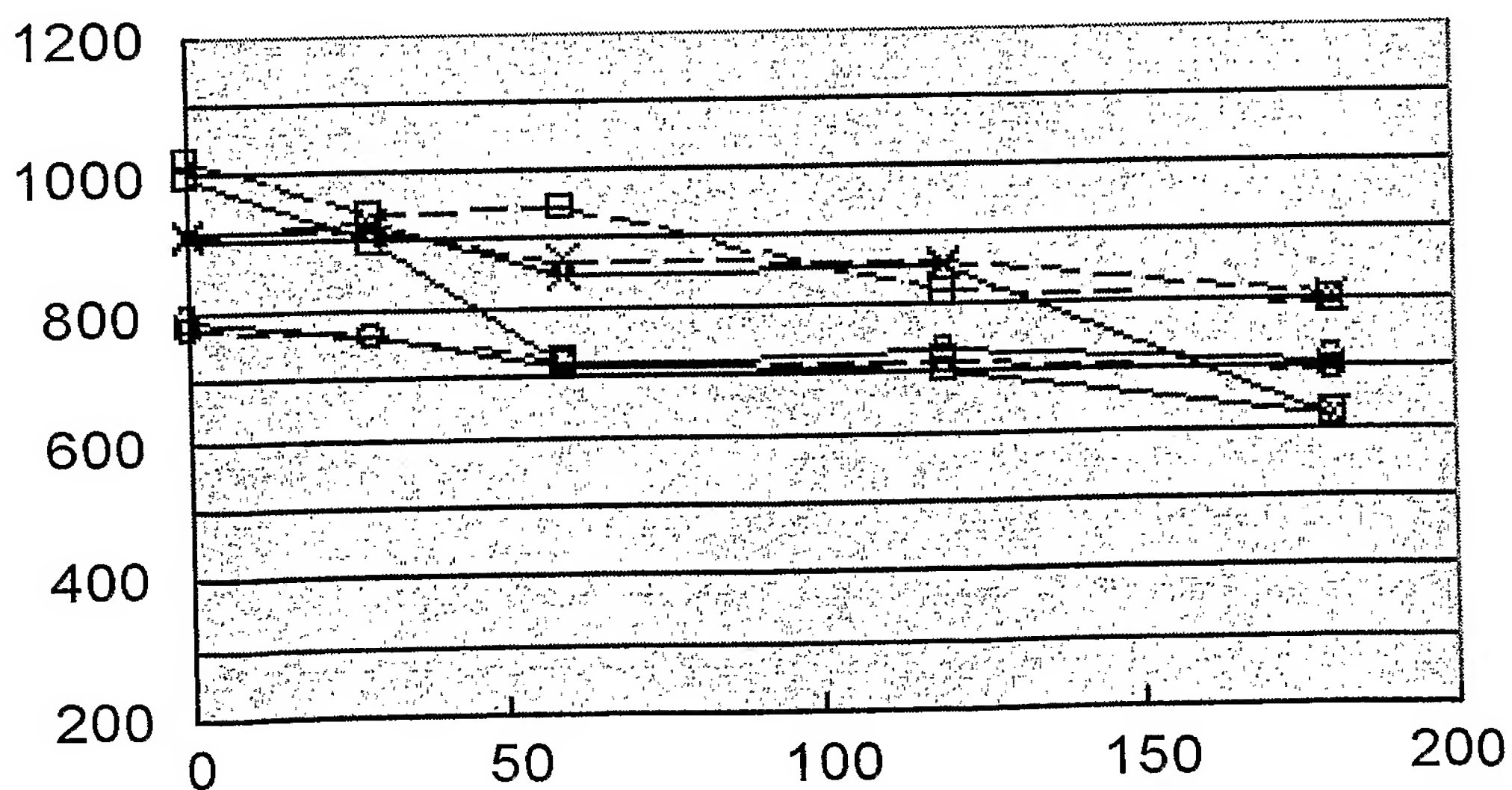
【図 8】



【図 9】
colony



【図 10】
colony



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 虫歯原因菌に対して溶菌作用を有する酵素、この酵素を用いた虫歯治療方法や予防方法などを提供する。

【解決手段】 この発明の提供する酵素はストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) が産生する溶菌酵素であり、*S. mutans* 及びストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*) を選択的に溶解する基質特異性を有するため、口腔内の食餌原性細菌を選択的に除去、あるいはその菌数を減少させることが可能となり、齲食の予防効果を発揮させることができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 4 1 9 1 2 3
受付番号	5 0 3 0 2 0 7 4 7 7 4
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0 0 9 3
作成日	平成 1 5 年 1 2 月 1 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年12月17日

特願 2 0 0 3 - 4 1 9 1 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

- | | |
|----------|-----------------------|
| 1. 変更年月日 | 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人 科学技術振興機構 |
| 2. 変更年月日 | 2 0 0 4 年 4 月 1 日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人科学技術振興機構 |